



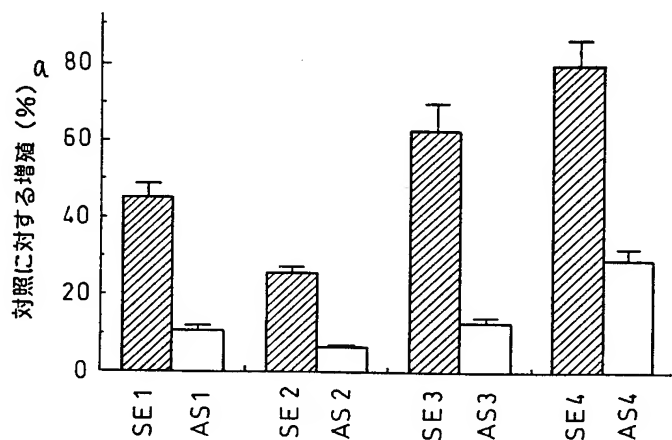
PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

| | | |
|--|-----------|--|
| (51) 国際特許分類6 A61K 48/00, 31/70 // C07H 21/02, 21/04, C12N 15/11, 15/63 | A1 | (11) 国際公開番号 WO96/38176 (43) 国際公開日 1996年12月5日 (05.12.96) |
| (21) 国際出願番号 PCT/JP96/01394 (22) 国際出願日 1996年5月24日 (24.05.96) (30) 優先権データ 特願平7/156672 1995年6月1日 (01.06.95) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 岸本忠三(KISHIMOTO, Tadamitsu)[JP/JP] 〒584 大阪府富田林市中野町3-5-31 Osaka, (JP) (71) 出願人; および (72) 発明者 杉山治夫(SUGIYAMA, Haruo)[JP/JP] 〒562 大阪府箕面市船場西2-19-30 Osaka, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 山上 保(YAMAGAMI, Tamotsu)[JP/JP] 〒569 大阪府高槻市真上町6-10-1-607 Osaka, (JP) 井上和司(INOUE, Kazushi)[JP/JP] 〒567 大阪府茨木市玉櫛2-30-17-203 Osaka, (JP) | | (74) 代理人 弁理士 石田 敬, 外(ISHIDA, Takashi et al.) 〒105 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, KE, KG, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO特許(KE, LS, MW, SD, SZ, UG), ユーラシア特許(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). 添付公開書類 国際調査報告書 |

(54) Title : LEUKEMIC CELL GROWTH INHIBITOR CONTAINING ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDE DERIVATIVE AGAINST WILMS' TUMOR GENE (WT1)

(54) 発明の名称 ウィルムス腫瘍遺伝子(WT1)に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体を含んで成る白血病細胞増殖阻害剤



a ... Growth rate as regards control (%)

(57) Abstract

A leukemic cell growth inhibitor containing antisense oligonucleotide derivatives against Wilms' tumor gene (WT1).

(57) 要約

ウィルムス腫瘍遺伝子 (WT1) に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体を含んで成る白血病細胞増殖阻害剤を提供する。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

| | | | | | | | |
|----|--------------|----|-------------|----|-------------|----|------------|
| AL | アルバニア | DE | ドイツ | LI | リヒテンシュタイン | PL | ポーランド |
| AM | アルメニア | DK | デンマーク | LC | セントルシア | PT | ポルトガル |
| AT | オーストリア | EE | エストニア | LK | スリランカ | RO | ルーマニア |
| AU | オーストラリア | ES | スペイン | LR | リベリア | RU | ロシア連邦 |
| AZ | アゼルバイジャン | FI | フィンランド | LS | レソト | SD | スーダン |
| BA | ボスニア・ヘルツェゴビナ | FR | フランス | LT | リトアニア | SE | スウェーデン |
| BB | バルバドス | GA | ガボン | LU | ルクセンブルグ | SG | シンガポール |
| BE | ベルギー | GB | イギリス | LV | ラトヴィア | SI | スロベニア |
| BF | ブルキナ・ファソ | GE | グルジア | MC | モナコ | SK | スロバキア |
| BG | ブルガリア | GN | ギニア | MD | モルドヴァ共和国 | SN | セネガル |
| BJ | ベナン | GR | ギリシャ | MG | マダガスカル | SZ | スワジランド |
| BR | ブラジル | HU | ハンガリー | MK | マケドニア旧ユーゴスラ | TD | チャド |
| BY | ベラルーシ | IE | アイルランド | | マウリタニア共和国 | TG | トーゴ |
| CA | カナダ | IL | イスラエル | ML | マリ | TM | トルクメニスタン |
| CF | 中央アフリカ共和国 | IS | アイスランド | MN | モンゴル | TR | トルコ |
| CG | コンゴ | IT | イタリア | MR | モーリタニア | TT | トリニダード・トバゴ |
| CH | スイス | JP | 日本 | MW | マラウイ | UA | ウクライナ |
| CI | コート・ジボアール | KE | ケニア | MX | メキシコ | UG | ウガンダ |
| CN | 中国 | KG | キルギスタン | NE | ニジェール | US | アメリカ合衆国 |
| CU | キューバ | KP | 朝鮮民主主義人民共和国 | NL | オランダ | UZ | ウズベキスタン |
| CZ | チェコ共和国 | KR | 大韓民国 | NO | ノルウェー | VN | ベトナム |
| | | KZ | カザフスタン | NZ | ニュージーランド | | |

明 細 書

ウィルムス腫瘍遺伝子（WT1）に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体を含んで成る白血病細胞増殖阻害剤

発明の分野

本発明はアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体を含んで成る、白血病細胞増殖阻害剤に関する。

背景技術

ウィルムス(Wilms) 腫瘍は、染色体 11p13 に位置するウィルムス腫瘍遺伝子（WT1）の両対立遺伝子の不活性化により生ずる小児腎腫瘍である(Call KM et al., Cell 60: 509, 1990)。WT1 の非コード上流配列 (C.E. Campbellら、Oncogene 9: 583-595, 1994)及びイントロンを含むコード領域(D.A.Haberら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 88: 9618-9622, (1991))はすでに報告されており、腫瘍等の増殖及び分化に関与することが予想される(D.A.Haberら、前掲)。

しかしながら、WT1 が白血病細胞の増殖に関与しており、WT1 に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体が白血病細胞の増殖を抑制・阻害することは知られていない。

発明の開示

従って本発明は、ウィルムス(Wilms) 腫瘍遺伝子（WT1）に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体を含んで成る白血病細胞の増殖阻害剤を提供するものである。

図面の簡単な説明

図 1 は、白血病細胞株 K 5 6 2 の増殖に対するオリゴヌクレオチドの阻害効果を示すグラフである。

図 2 は、オリゴヌクレオチド S E 3 及び A S 3 の濃度と、白血病細胞株 K 5 6 2 の増殖との関連を示すグラフである。

図 3 は、オリゴヌクレオチド S E 4 及び A S 4 の濃度と、白血病細胞株 K 5 6 2 の増殖との関係を示すグラフである。

図 4 は、オリゴヌクレオチド S E 3 及び A S 3 が白血病細胞株 K 5 6 2 の増殖に及ぼす効果を経時的に示すグラフである。

図 5 は、種々のオリゴヌクレオチドが白血病細胞株 K 5 6 2 の増殖に及ぼす影響を示すグラフである。

図 6 は、W T 1 発現陽性の白血病細胞株 H E L の増殖に対する種々のオリゴヌクレオチドの阻害効果を示すグラフである。

図 7 は、W T 1 発現陽性の白血病細胞株 T H P - 1 の増殖に対する種々のオリゴヌクレオチドの阻害効果を示すグラフである。

図 8 は、W T 1 発現陰性の悪性リンパ腫細胞株 U 9 3 7 の増殖に対する種々のオリゴヌクレオチドの阻害効果を示すグラフである。

図 9 は、白血病患者由来の骨髓単核球細胞からの白血病細胞コロニーの形成に対するオリゴヌクレオチド S E 3 及び A S 3 の効果を示すグラフである。

図 1 0 は、健康な志願者由来の骨髓単核球細胞からの顆粒球マクロファージコロニーの形成に対するオリゴヌクレオチド S E 3 及び A S 3 の効果を示すグラフである。

図 1 1 において、A は K 5 6 2 細胞の培養液に種々の W T 1 アンチセンスオリゴヌクレオチドを添加した場合に細胞中の W T 1 蛋白質のレベルが低下したことを示す電気泳動図の図面代用写真であり、B は A M L を有する患者からの新鮮な白血病細胞に W T 1 アンチ

センスオリゴヌクレオチドを添加した場合に細胞中のWT1蛋白質のレベルが低下したことを示す。

具体的な説明

本発明は、WT1に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体を含んで成る白血病細胞増殖阻害剤を提供する。本発明で使用するアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、例えば、WT1の転写キャッピング部位に対するもの、翻訳開始領域に対するもの、エクソンに対するものまたはイントロンに対するものなどのWT1に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体である。

例えばWT1の転写キャッピング部位を含む領域のセンスDNA鎖の塩基配列は配列番号：9で表わされ、またWT1のコード領域のエクソン1～10のセンスDNA鎖の塩基配列は配列番号：10～19で表わされるが、本発明はこのようなWT1のセンスDNA鎖の塩基配列に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体を用いる。このアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、通常WT1のアンチセンスDNA鎖またはRNA鎖の連続した5～50個、好ましくは、9～30個の塩基またはWT1のDNA鎖またはRNA鎖に結合することができるものであれば、断続的または部分的に相補的な5～70個、好ましくは、9～50個の塩基から成るアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体である。

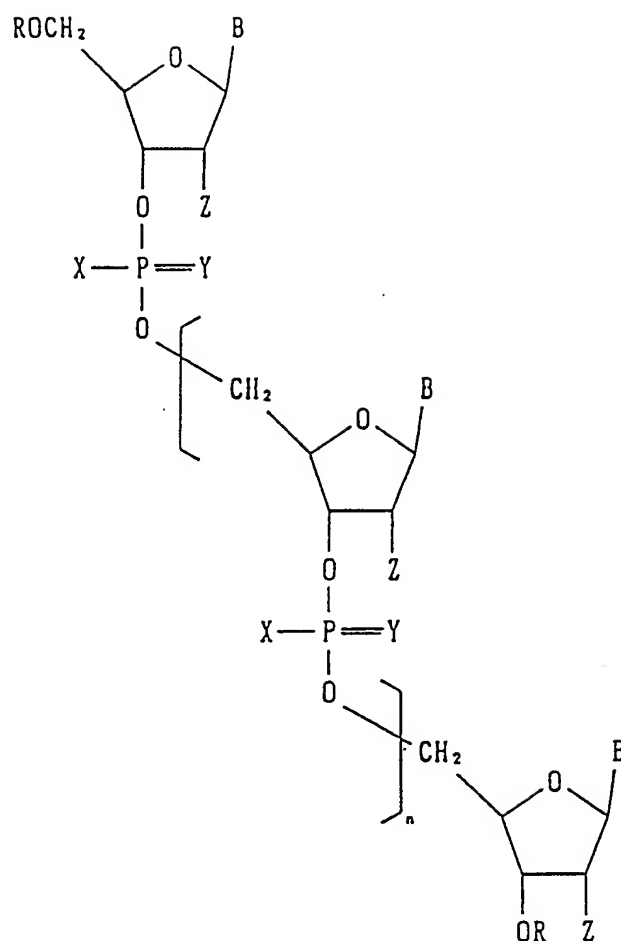
転写キャッピング部位に対するものとしては、例えば次の塩基配列：5'-AGGGTCGAATGCGGTGGG-3'（配列番号：2）及び5'-TCAATAAGAGGGGCCGG-3'（配列番号：4）などのものが挙げられる。また、翻訳開始領域に対するものとしては、翻訳開始コドンATG並びにその上流及び／又は下流を含む領域に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体が挙げられ、例えば次の塩基配列：5'-G

TCGGAGCCCATTTGCTG-3' (配列番号：6) などが挙げられる。

また、WT1のコード領域には10個のエクソンが含まれており、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、これらのエクソンのいずれかに含まれる配列に対するもの、又はスプライシング後に連続するいずれか2個のエクソンにわたる配列に対するものあるいは、連続するイントロンとエクソンにわたる配列に対するもの、全てのイントロン及び3', 5'側非コード領域の配列に対するものである。1例として、第6エクソンに対するものであり、次の塩基配列：5'-CGTTGTGTGGTTATCGCT-3' (配列番号：8) に対するものが挙げられる。

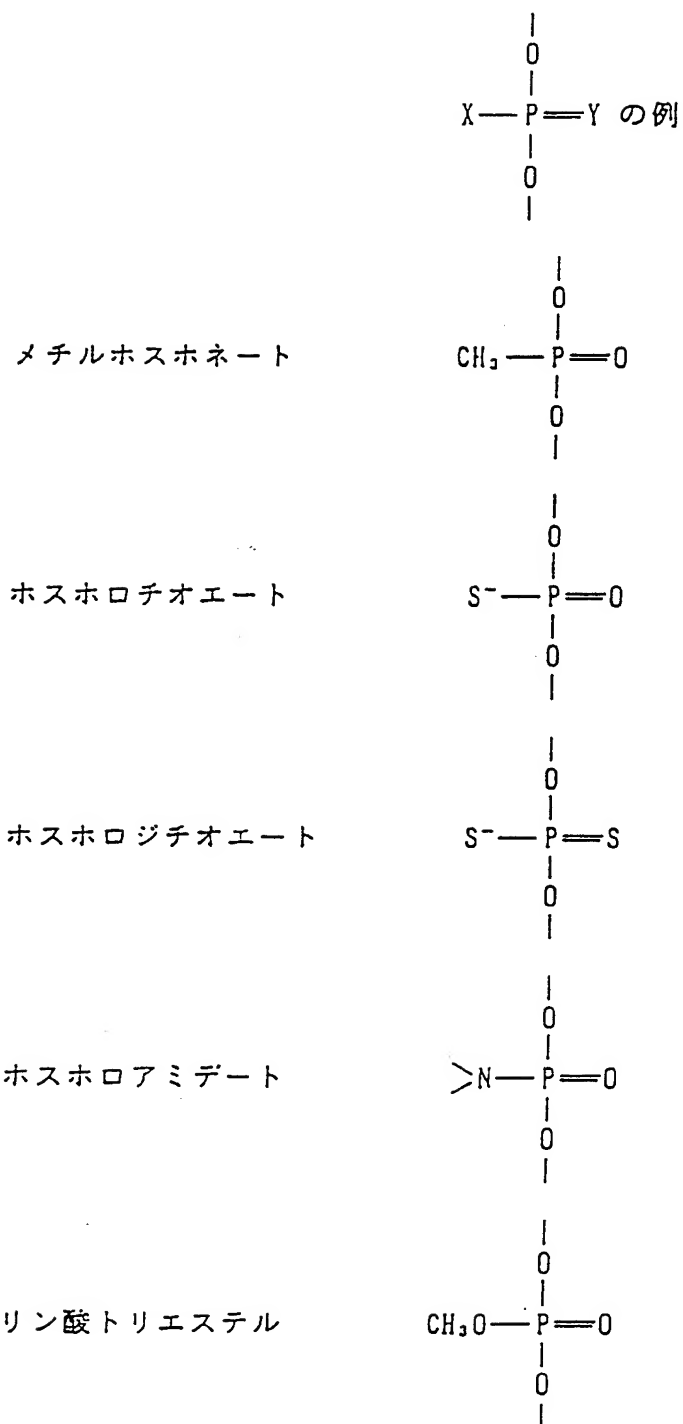
さらに、WT1のDNA鎖またはRNA鎖と断続的または部分的に相補的な塩基配列を有する本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は対応する領域については特に問わないが、これらの中には、WT1のDNA鎖またはRNA鎖を切断する機能を有するリボザイムのようなものも含まれる。

本発明において使用されるアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体の構造は、化学式1に示したとおりであるが、Xは独立して酸素(O)、イオウ(S)、低級アルキル基あるいは一級アミンまたは二級アミンのいずれでもよい。Yは独立して酸素(O)あるいはイオウ(S)のいずれでもよい。Zは水素または水酸基である。BはZが水素のときアデニン、グアニン、チミン、あるいはシトシンのいずれかから選ばれ、Zが水酸基のときアデニン、グアニン、ウラシルあるいはシトシンのいずれかから選ばれ、主としてWT1をコードするDNA又はmRNAの相補的オリゴヌクレオチドである。Rは独立して水素またはジメトキシトリチル基あるいは低級アルキル基である。nは7-28である。



化学式 1

好ましいアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体としては修飾されていないアンチセンスオリゴヌクレオチドだけでなく、修飾されたアンチセンスオリゴヌクレオチドでもよい。この様な修飾体として、例えば前述のメチルホスホネート型又はエチルホスホネート型のような低級アルキルホスホネート修飾体、その他ホスホロチオエート修飾体あるいはホスホロアミデート修飾体等が挙げられる（化学式 2 参照）。



化学式 2

これらのアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は次のとおり常

法によって得ることができる。

化学式 1 の X 及び Y が O、Z が水素又は水酸基であるアンチセンスオリゴヌクレオチドは市販の DNA 合成装置（例えば Applied Biosystems 社製など）によって容易に合成される。

Z が水素であるアンチセンスオリゴデオキシリボヌクレオチドの合成法はホスホロアミダイトを用いた固相合成法、ハイドロジェンホスホネートを用いた固相合成法などで得ることができる。

例えば、T. Atkinson, M. Smith, in *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, ed. M. J. Gait, IRL Press, 35-81 (1984); M. H. Caruthers, *Science*, 230, 281 (1985); A. Kume, M. Fujii, M. Sekine, M. Hata, *J. Org. Chem.*, 49, 2139 (1984); B. C. Froehler, M. Matteucci, *Tetrahedron Lett.*, 27, 469 (1986); P. J. Gar egg, I. Lindh, T. Regberg, J. Stawinski, R. Stromberg, C. Henrichson, *ibid*, 27, 4051 (1986);

B. S. Sproat, M. J. Gait, in *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, ed. M. J. Gait, IRL Press, 83-115 (1984); S. L. Beaucage and M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.*, 22, 1859-1862 (1981); M. D. Matteucci and M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.*, 21, 719-722 (1980); M. D. Matteucci and M. H. Caruthers, *J. Am. Chem. Soc.*, 103, 3185-3191 (1981)を参照のこと。

X が低級アルコキシ基であるリン酸トリエステル修飾体は、常法、例えば化学合成で得られたオリゴヌクレオチドをトシルクロリドの DMF / メタノール / 2, 6 - ールチジン溶液で処理することにより得ることができる (Moody H. M., et al., *Nucleic Acids Res.*, 17, 4769-4782 (1989))。

X がアルキル基であるアルキルホスホネート修飾体は、常法、例えばホスホアミダイトを用いて得ることができる (M. A. Dorman, et

.al., Tetrahedron, 40, 95-102 (1984); K.L. Agarwal and F. Riftina, Nucleic Acids Res., 6, 3009-3024 (1979))。

XがSであるホスホロチオエート修飾体は、常法、例えばイオウを用いた固相合成法(C.A. Stein, et.al., Nucleic Acids Res., 16, 3209-3221 (1988))あるいはテトラエチルチウラム ジスルフィドを用いて、固相合成法により得ることができる(H. Vu and B.L. Hirschbein, Tetrahedron Letters, 32, 3005-3008 (1991))。

X, YがともにSであるホスホロジチオエート修飾体は、例えばビスアミダイトをチオアミダイトに変換しイオウを作用させることにより固相合成法により得ることができる(W.K.-D. Brill, et.al., J. Am. Chem. Soc., 111, 2321-2322 (1989))。

Xが一級アミンあるいは二級アミンであるホスホロアミデート修飾体は、例えばハイドロジェンホスホネートを一級あるいは二級アミンで処理することにより固相合成法で得ることができる(B. Froehner, et.al. Nucleic Acids Res., 16, 4831-4839 (1988))。あるいは、アミダイトをtert-ブチルヒドロパーオキシドで酸化しても得ることができる(H. Ozaki, et.al., Tetrahedron Lett., 30, 5899-5902 (1989))。

Zが水酸基であるアンチセンスオリゴリボヌクレオチドの合成法は、アンチセンスオリゴデオキシリボヌクレオチドに比べて、リボース(糖)に2'-水酸基があるためその保護を行わなければならない点できわめて複雑ではあるが、保護基およびリン酸化方法を適宜選択することによって合成することができる(微生物学基礎講座 8巻、遺伝子工学、大塚栄子、三浦一伸共著、安藤忠彦、坂口健二編、1987年10月10日、共立出版株式会社発行参照)。

精製および純度確認は、高速液体クロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で行うことができる。分子量の確認は、E

electrospray Ionization Mass Spectrometry又は Fast Atom Bombardment-Mass Spectrometryで行うことができる。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、genomic DNA から matureな mRNA に至るいかなる段階においても作用し、その発現を抑制することによって白血病細胞の増殖を阻害すると考えられる。従って、本願発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは白血病の治療のために有効であると期待される。

さらに本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、後述するとおり、正常な骨髄細胞の増殖を阻害することなく、特異的に白血病細胞の増殖を阻害すると考えられる。したがって、白血病患者の細胞、例えば骨髄細胞または末梢血を体外へ取り出し、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体で *in vitro* 処理して白血病細胞の増殖を阻害しておいて、正常な骨髄細胞だけを再び体内に戻すというような「自家骨髄移植」「自家末梢血幹細胞移植」への応用も可能である。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、それらに対して不活性な適当な基剤と混和して塗布剤、パップ剤などの外用剤とすることができる。

また、必要に応じて、賦形剤、等張化剤、溶解補助剤、安定化剤、防腐剤、無痛化剤等を加えて錠剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、リポソームカプセル剤、注射剤、液剤、点鼻剤など、さらに凍結乾燥剤とすることができる。これらは常法に従って調製することができる。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は患者の患部に直接適用するか、または血管内に投与するなどして結果的に患部に到達し得るように患者に適応させる。さらに持続性、膜透過性を高めるアンチセンス封入素材を用いることもできる。例えば、リポゾ

ーム、ポリーLーリジン、リピッド、コレステロール、リポフェクチン又はこれらの誘導体が挙げられる。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体の投与量は、患者の状態、年齢、性別、体重などに応じて適宜調整し好ましい量を用いることができる。また、その投与方法は、患者の状態、薬剤形態などに応じ、経口投与、筋肉内投与、腹腔内投与、皮内投与、皮下投与、静脈内投与、動脈内投与、直腸投与などの種々の投与方法から適宜好ましい方法を用いることができる。

以下本発明を実施例において詳しく説明する。

実施例

合成例 1.

以下に使用するオリゴデオキシリボヌクレオチド（配列番号：1～8）を、自動合成装置（Applied Biosystems）を用いて合成し、高速液体クロマトグラフィーにより精製し、エタノール沈澱を3回行い、そしてリン酸緩衝液に懸濁した。合成したオリゴヌクレオチドは次の通りである。

配列番号：1 転写キャッピング部位のセンス配列（S E 1）

配列番号：2 転写キャッピング部位のアンチセンス配列（A S 1）

配列番号：3 転写キャッピング領域のセンス配列（S E 2）

配列番号：4 転写キャッピング領域のアンチセンス配列（A S 2）

配列番号：5 翻訳開始領域のセンス配列（S E 3）

配列番号：6 翻訳開始領域のアンチセンス配列（A S 3）

配列番号：7 エクソン6のセンス配列（S E 4）

配列番号：8 エクソン6のアンチセンス配列（A S 4）

実施例 1.

W T 1 発現陽性の白血病細胞株 K 5 6 2 を 5×10^4 個/ml、 $100 \mu\text{l}$ / ウェルの量で、平底 96 - ウェルプレート内の、ウシ胎児血清 (F C S) を含有しない R P M I 1 6 4 0 培地に接種した。各オリゴヌクレオチドを、3 連のウェルに、最終濃度が $200 \mu\text{g}$ / ml となるように添加した。2 時間のインキュベーションの後、各ウェルに最終濃度が 10 % となるように F C S を添加した。24 時間毎に、前記の量の半分のオリゴヌクレオチドを培養物に添加した。

96 時間培養した後、色素排除法により生存細胞を計数した。対照培養物として、ヌクレオチドを含有しない同じ体積の P B S を添加し、そしてこの対照培養物の細胞数を 100 % とした。

この結果を図 1 に示す。この図から明らかな通り、いずれのアンチセンスオリゴヌクレオチドも、対応するセンスオリゴヌクレオチドに比べて強く細胞の増殖を阻害した。

実施例 2.

実施例 1 と同様の実験を行ったが、オリゴヌクレオチド S E 3 及び A S 3 を種々の濃度で添加した。図 2 から明らかな通り、センスオリゴヌクレオチド (S E 3) は細胞の増殖をほとんど阻害しなかったが、アンチセンスオリゴヌクレオチド (A S 3) は濃度依存的に細胞の増殖を阻害した。

実施例 3.

実施例 1 と同様の実験を行ったが、オリゴヌクレオチド S E 4 及び A S 4 を種々の濃度で添加した。図 3 から明らかな通り、センスオリゴヌクレオチド (S E 4) は細胞の増殖をほとんど阻害しなかったが、アンチセンスオリゴヌクレオチド (A S 4) は濃度依存的に細胞の増殖を阻害した。

実施例 4.

実施例 1 と同様の実験を行った。但し、細胞を、平底 24 - ウェルプレート中で 2.5×10^4 個/ml、1 ml/ウェルの量で培養した。オリゴヌクレオチド SE 3 及び AS 3 を添加し、2 ~ 5 日間に毎日生存細胞数を計数した。結果を図 4 に示す。図から明らかな通り、センスオリゴヌクレオチドを添加した場合、対照の場合と同様に細胞の増殖が見られたが、アンチセンスオリゴヌクレオチドを添加した場合、細胞の増殖は抑制された。

実施例 5.

実施例 1 と同様の実験を行った。但し、オリゴヌクレオチドとして、SE 3 及び AS 3、並びにミエロパーオキシダーゼ (MPO) 遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド 5' -AGAGAAGAAGGGAACCCC-3' (配列番号: 20) (MPO-AS) 及び血液凝固因子 V (FV) に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド 5' -GCGTGGCAGCCTGGGAA-3' (配列番号: 21) (FV-AS) を用いた。図 5 から明らかなように、AS 3 を用いた場合のみ細胞の増殖が阻害された。

実施例 6.

実施例 1 と同様の実験を行ったが、実験細胞として、WT 1 発現陽性細胞株 HEL 及び THP-1、並びに WT 1 発現陰性細胞株 U937 を用いた。オリゴヌクレオチドとしては、実施例 1 の場合と同じ 8 種類を用いた。WT 1 発現陽性細胞系 HEL (図 6) 又は THP-1 (図 7) を用いた場合には、アンチセンスオリゴヌクレオチドにより細胞の増殖は阻害された。これに対して、WT 1 発現陰性細胞株 U937 (図 8) を用いた場合、アンチセンスオリゴヌクレオチドを添加しても細胞の増殖は阻害されなかった。

実施例 7.

白血病患者及び健康な志願者からの骨髓細胞をヘパリン処理し、RPMI 1640培地に懸濁し、そしてFicoll-Hypaque密度勾配遠心により骨髓単核球細胞を得た。GM-CSF (100 ng/ml) 及びIL-3 (100 ユニット/ml) を含む α -MEMを入れた平底96-ウェルプレートに、上記の単核細胞を 1.5×10^6 個/ml、 100μ l/ウェルの量でプレートした。オリゴヌクレオチド (SE3 及びAS3) による処理は実施例1と同様にした。

96時間後、細胞を集め、そしてメチルセルロース培地 [1.2%メチルセルロース α -MEM、20%FCS、GM-CSF (100 ng/ml)、G-CSF (100 ng/ml)、IL-3 (100 ユニット/ml) 及びSCF (10 ng/ml)] にプレートした。培養は3連で行った。14日目に白血病細胞コロニー (CFU-L) 及び顆粒球-マクロファージコロニー (CFU-GM) を計数した。

図9に白血病患者4名 (急性骨髓性白血病 (AML) 2名、慢性骨髓性白血病 (CML) 2名) からのサンプルでの白血病コロニーの形成を示す。アンチセンスオリゴヌクレオチドによりコロニーの出現が阻害されたことがわかる。図10には、健康な志願者からのサンプルでの顆粒球マクロファージコロニーの出現を示す。アンチセンスオリゴヌクレオチドによってもコロニーの形成は阻害されなかった。

実施例 8.

24-ウェルプレート中で、 5×10^4 細胞/ウェルのK562細胞 (A) 又はAMLを有する患者からの新鮮な白血病細胞 (B) に、ランダムオリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチドAS1、オリゴヌクレオチドAS2又はオリゴヌクレオチドAS3を 200μ g/mlの濃度で添加し、さらに24時間毎に 100μ g/mlの濃度で添加した。オリゴヌクレオチドによる最初の処理から4日後に細

胞を収得し、PBSにより洗浄し、そしてLaemliのサンプル緩衝液により細胞溶解した。

2×10^4 個の細胞からの各細胞溶解物を5分間煮沸し、そして次に7.5%ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル中の各レーンに適用した。電気泳動の後、蛋白質をインモビロン(Immobilon) ポリビニリデンジフルオリド・フィルター (Millipore Corp. MA、米国) に移行させた。このフィルターを、合成ポリペプチド (アミノ酸位置 177-192 ; Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln (配列番号: 22) に対する抗-WT1 ポリクローナル抗体によりプローブし、そして次にホースラディッシュペーパーオキシダーゼ-結合抗-免疫グロブリン抗体 (Amersham, Little Chalfont、英国) により処理した。洗浄後、フィルターを検出試薬 (Amersham, Little Chalfont、英国) に1時間浸漬し、そして1~5分間オートラジオグラフ処理した。

TBST (0.05% Tween 20 を含有するTris-緩衝液) により2回洗浄した後、フィルターを抗-アクチンモノクローナル抗体 (Oncogene Science Inc., NY、米国) によりプローブし、そして上記のようにしてオートラジオグラフ処理した。

WT1蛋白質及びアクチンに対応するバンドの密度をデンストメーターCS-9000 (シミズ、京都) により測定し、そしてWT1/アクチン比を計算した。

結果を図11のA及びBに示す。この図において、レーン1はランダムオリゴヌクレオチドを添加した場合、レーン2はオリゴヌクレオチドAS3を添加した場合、レーン3はオリゴヌクレオチドAS1を添加した場合、そしてレーン4はオリゴヌクレオチドAS2を添加した場合の結果を示す。この図のAはK562細胞を用いた場合、そしてBはAMLを有する患者からの新鮮な白血病細胞を用

いた場合の結果を示す。

Aから明らかなように、K 5 6 2細胞の培地にW T 1オリゴヌクレオチドを添加した場合、W T 1蛋白質のレベルが有意に低下した。他方、対照としてのランダムオリゴヌクレオチドはW T 1蛋白質レベルに影響を与えなかった。また、Bから明らかなように、W T 1オリゴヌクレオチドをA M Lを有する患者から新たに単離した白血病細胞の培地に添加した場合、W T 1蛋白質レベルが有意に低下した。これらの結果は、W T 1アンチセンスオリゴヌクレオチドが、W T 1蛋白質レベルの低下を介して白血病細胞の増殖を特異的に阻害したことを明瞭に示している。

産業上の利用可能性

以上の通り、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは白血病細胞の増殖の阻害のために有効であり、従って新規な白血病治療剤として期待される。

配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 18

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 合成DNA

配列

CCCACCGCAT TCGACCCT

18

配列番号 : 2

配列の長さ : 18

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 合成DNA

配列

AGGGTCGAAT GCGGTGGG

18

配列番号 : 3

配列の長さ : 18

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 合成DNA

配列

CCGGCCCCTC TTATTGTA

18

配列番号 : 4

配列の長さ : 18

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 合成DNA

配列

TCAAATAAGA GGGGCCGG

18

配列番号 : 5

配列の長さ : 18

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 合成DNA

配列

CAGCAAATGG GCTCCGAC

18

配列番号 : 6

配列の長さ : 18

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 合成DNA

配列

GTCGGAGCCC ATTTGCTG

18

配列番号 : 7

配列の長さ : 18

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 合成DNA

配列

AGCGATAACC ACACAACG

18

配列番号 : 8

配列の長さ : 18

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類：合成DNA

配列

CGTTGTGTGG TTATCGCT

18

配列番号：9

配列の長さ：1 2 7 2

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列の種類：合成DNA

配列

| | |
|---|------|
| TGGTATCCTC GACCAGGGCC ACAGGCAGTG CTCGGCGGAG TGGCTCCAGG AGTTACCCGC | 60 |
| TCCCTGCCGG GCTTCGTATC CAAACCCTCC CCTTCACCCC TCCTCCCCAA ACTGGGCGCC | 120 |
| AGGATGCTCC GGCCGAATA TACGCAGGCT TTGGGCGTTT GCCAAGGGTT TTCTTCCCTC | 180 |
| CTAAACTAGC CGCTGTTTTT CCGGCTTAAC CGTAGAAGAA TTAGATATTC CTCACTGGAA | 240 |
| AGGGAACTA AGTGCTGCTG ACTCCAATTT TAGGTAGGCG GCAACCGCCT TCCGCCTGGC | 300 |
| GCAAACCTCA CCAAGTAAAC AACTACTAGC CGATCGAAAT ACGCCCGGCT TATAACTGGT | 360 |
| GCAACTCCCG GCCACCCAAC TGAGGGACGT TCGCTTTCAG TCCCGACCTC TGAACCCAC | 420 |
| AAAGGGCCAC CTCTTTCCCC AGTGACCCCA AGATCATGGC CACTCCCCTA CCCGACAGTT | 480 |
| CTAGAGCAAG AGCCAGACTC AAGGGTGCAA AGCAAGGGTA TACGCTTCTT TGAAGCTTGA | 540 |
| CTGAGTTCTT TCTGCGCTTT CCTGAAGTTC CCGCCCTCTT GGAGCCTACC TGCCCCCTCC | 600 |
| TCCAAACCAC TCTTTTAGAT TAACAACCCC ATCTCTACTC CCACCGCATT CGACCCTGCC | 660 |
| CGGACTCACT GCTACTGAAC GGA CTCTCCA GTGAGACGAG GCTCCACAC TGGCGAAGGC | 720 |
| AAGAAGGGGA GGTGGGGGA GGGTTGTGCC ACACCGGCCA GCTGAGAGCG CGTGTGGGT | 780 |
| TGAAGAGGAG GGTGTCTCCG AGAGGGACGC TCCCTCGGAC CCGCCCTCAC CCCAGCTGCG | 840 |
| AGGGCGCCCC CAAGGAGCAG CGCGCGCTGC CTGGCCGGGC TTGGGCTGCT GAGTGAATGG | 900 |
| AGCGGCCGAG CCTCCTGGCT CCTCCTCTC CCCGCGCCG CGGCCCTCT TATTTGAGCT | 960 |
| TTGGGAAGCT GAGGGCAGCC AGGCAGCTGG GGTAAGGAGT TCAAGGCAGC GCCACACCC | 1020 |
| GGGGGCTCTC CGCAACCCGA CCGCCTGTGG CTCCCCACT TCCCGCCCTC CCTCCACCT | 1080 |

| | |
|--|------|
| ACTCATTAC CCACCCACCC ACCCAGAGCC GGGACGGCAG CCCAGGCGCC CGGGCCCCGC | 1140 |
| CGTCTCCTCG CCGCGATCCT GGAATTCTC TTGCTGCAGG ACCCGGCTTC CACGTGTGTC | 1200 |
| CCGGAGCCGG CGTCTCAGCA CACGCTCCGC TCCGGGCTG GGTGCCTACA GCAGCCAGAG | 1260 |
| CAGCAGGGAG TC | 1272 |

配列番号 : 1 0

配列の長さ : 4 5 7

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 合成DNA

配列の特徴 : WT 1 遺伝子のエクソン 1 の一部分

配列

| | |
|---|-----|
| TCTGAGCCTC AGCAAATGGG CTCCGACGTG CGGGACCTGA ACGCGCTGCT GCCCGCCGTC | 60 |
| CCCTCCCTGG GTGGCGGCGG CGGCTGTGCC CTGCCTGTGA GCGGCGCGGC GCAGTGGGCG | 120 |
| CCGGTGCTGG ACTTTGCGCC CCCGGGCGCT TCGGCTTACG GGTGCTTGGG CGGCCCCGCG | 180 |
| CCGCCACCGG CTCCGCCGCC ACCCCGCGG CCGCCGCCTC ACTCCTTCAT CAAACAGGAG | 240 |
| CCGAGCTGGG GCGGCGCGGA GCCGCACGAG GAGCAGTGCC TGAGCGCCTT CACTGTCCAC | 300 |
| TTTTCCGGCC AGTTCACTGG CACAGCCGGA GCCTGTGCT ACGGGCCCTT CGGTCCTCCT | 360 |
| CCGCCAGCC AGGCGTCATC CGGCCAGGCC AGGATGTTTC CTAACGCGCC CTACCTGCCC | 420 |
| AGCTGCCTCG AGAGCCAGCC CGCTATTGCG AATCAGG | 457 |

配列番号 : 1 1

配列の長さ : 1 2 3

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 合成DNA

配列の特徴 : WT 1 遺伝子のエクソン 2

配列

| | |
|---|----|
| GTTACAGCAC GGTCACCTTC GACGGGACGC CCAGCTACGG TCACACGCCC TCGCACCATG | 60 |
|---|----|

CGGCGCAGTT CCCCAACCAC TCATTCAAGC ATGAGGATCC CATGGGCCAG CAGGGCTCGC 120
TGG 123

配列番号 : 1 2

配列の長さ : 1 0 3

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 合成DNA

配列の特徴 : WT 1 遺伝子のエクソン 3

配列

GTGAGCAGCA GTACTCGGTG CCGCCCCCGG TCTATGGCTG CCACACCCCC ACCGACAGCT 60
GCACCGGCAG CCAGGCTTTG CTGCTGAGGA CGCCCTACAG CAG 103

配列番号 : 1 3

配列の長さ : 7 8

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 合成DNA

配列の特徴 : WT 1 遺伝子のエクソン 4

配列

TGACAATTTA TACCAAATGA CATCCCAGCT TGAATGCATG ACCTGGAATC AGATGAACCT 60
AGGAGCCACC TTAAAGGG 78

配列番号 : 1 4

配列の長さ : 5 1

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 合成DNA

配列の特徴 : WT 1 遺伝子のエクソン 5

配列

AGTTGCTGCT GGGAGCTCCA GCTCAGTGAA ATGGACAGAA GGGCAGAGCA A

51

配列番号 : 1 5

配列の長さ : 9 7

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 合成DNA

配列の特徴 : WT 1 遺伝子のエクソン 6

配列

CCACAGCACA GGGTACGAGA GCGATAACCA CACAACGCCC ATCCTCTGCG GAGCCCAATA

60

CAGAATACAC ACGCACGGTG TCTTCAGAGG CATTGAG

97

配列番号 : 1 6

配列の長さ : 1 5 1

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 合成DNA

配列の特徴 : WT 1 遺伝子のエクソン 7

配列

GATGTGCGAC GTGTGCCTGG AGTAGCCCCG ACTCTTGAC GGTCCGGCATC TGAGACCACT

60

GAGAAACGCC CCTTCATGTG TGCTTACCCA GGCTGCAATA AGAGATATTT TAAGCTGTCC

120

CACTTACAGA TGCACAGCAG GAAGCACACT G

151

配列番号 : 1 7

配列の長さ : 9 0

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 合成DNA

配列の特徴 : WT 1 遺伝子のエクソン 8

配列

GTGAGAAACC ATACCAGTGT GACTTCAAGG ACTGTGAACG AAGGTTTTCT CGTTCAGACC 60
AGCTCAAAAG ACACCAAAGG AGACATACAG 90

配列番号 : 1 8

配列の長さ : 9 3

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 合成DNA

配列の特徴 : WT 1 遺伝子のエクソン 9

配列

GTGTGAAACC ATTCCAGTGT AAAACTTGTG AGCGAAAGTT CTCCCGGTCC GACCACCTGA 60
AGACCCACAC CAGGACTCAT ACAGGTAAAA CAA 93

配列番号 : 1 9

配列の長さ : 1 5 8

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 合成DNA

配列の特徴 : WT 1 遺伝子のエクソン 1 0 の一部分

配列

GTGAAAAGCC CTTCAGCTGT CGGTGGCCAA GTTGTGAGAA AAAGTTTGCC CGGTCAGATG 60
AATTAGTCCG CCATCACAAC ATGCATCAGA GAAACATGAC CAAACTCCAG CTGGCGCTTT 120
GAGGGGTCTC CCTCGGGGAC CGTTCAGTGT CCCAGGCA 158

配列番号 : 2 0

配列の長さ : 1 8

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 合成DNA

配列

AGAGAAGAAG GGAACCCC

18

配列番号 : 2 1

配列の長さ : 1 8

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 合成DNA

配列

GCGTGGGCAG CCTGGGAA

18

配列番号 : 2 2

配列の長さ : 1 6

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : 合成ペプチド

配列

Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln

5

10

15

請 求 の 範 囲

1. ウイルムス腫瘍遺伝子 (WT1) に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体を含んで成る白血病細胞増殖阻害剤。

2. 前記アンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体が、ウイルス腫瘍遺伝子の転写キャッピング部位の連続する少なくとも9個のヌクレオチドに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項1に記載の白血病細胞増殖阻害剤。

3. 前記アンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体が、次の塩基配列：

5' -AGGGTCGAATGCGGTGGG-3' (配列番号：2) 又は

5' -TCAAATAAGAGGGGCCGG-3' (配列番号：4)

を有する、請求項2に記載の白血病細胞増殖阻害剤。

4. 前記アンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体が、ウイルス腫瘍遺伝子の翻訳開始領域の連続する少なくとも9個のヌクレオチドに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項1に記載の白血病細胞増殖阻害剤。

5. 前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、次の塩基配列：

5' -GTCGGAGCCCATTTGCTG-3' (配列番号：6)

を有する、請求項4に記載の白血病細胞増殖阻害剤。

6. 前記アンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体が、ウイルス腫瘍遺伝子のエクソン中の連続する少なくとも9個のヌクレオチドに対応するアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項1に記載の白血病細胞増殖阻害剤。

7. 前記エクソンが第6エクソンである、請求項6に記載の白血病細胞増殖阻害剤。

8. 前記アンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体が、次の塩基配

列：

5' -CGTTGTGTGGTTATCGCT- 3' (配列番号：8)

を有する、請求項7に記載の白血病細胞増殖阻害剤。

Fig.1

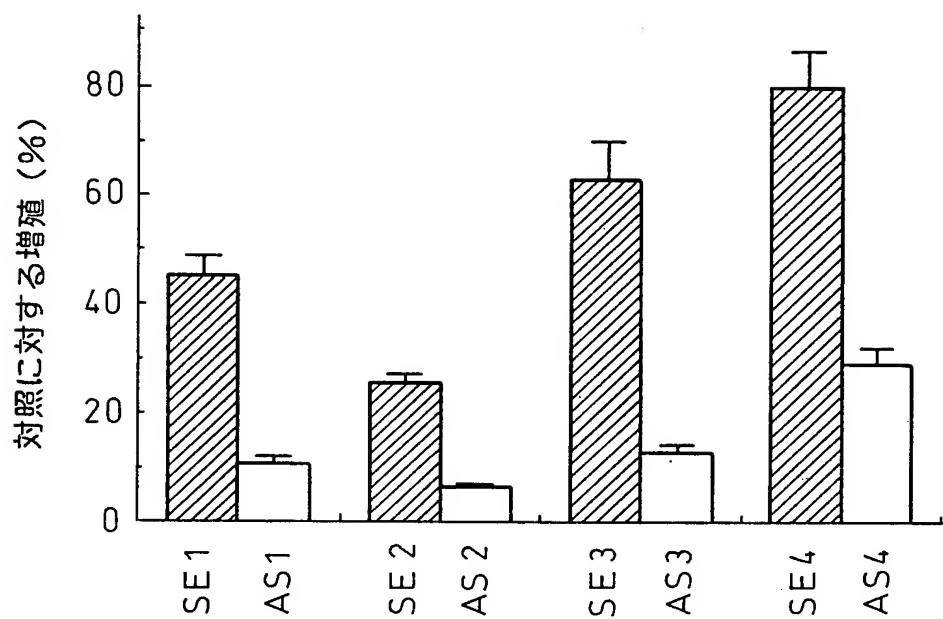


Fig.2

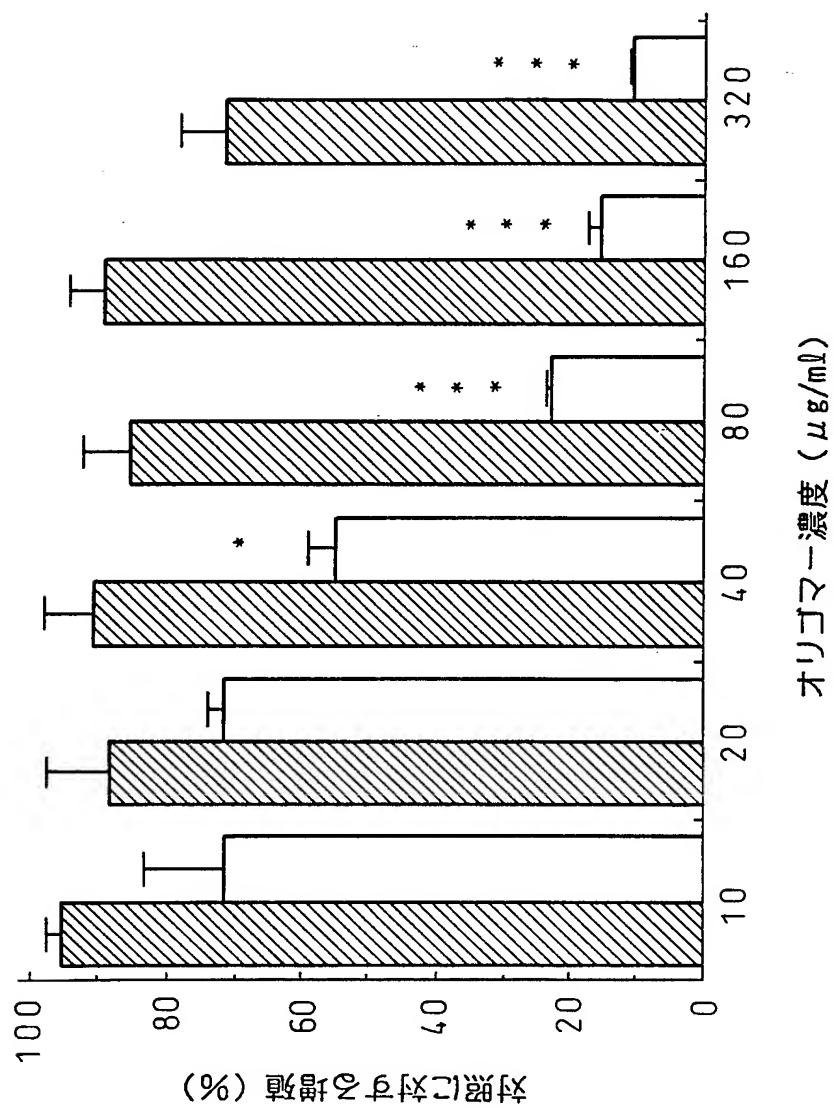


Fig.3

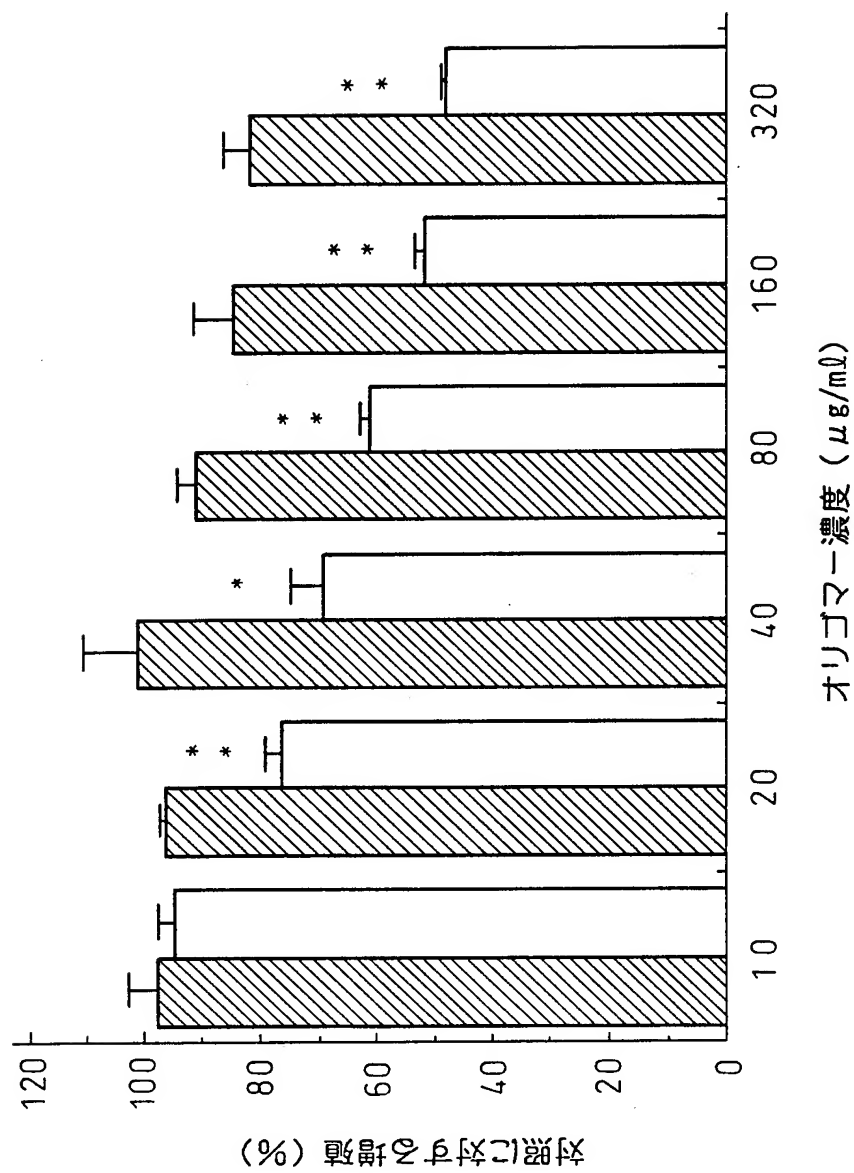


Fig.4

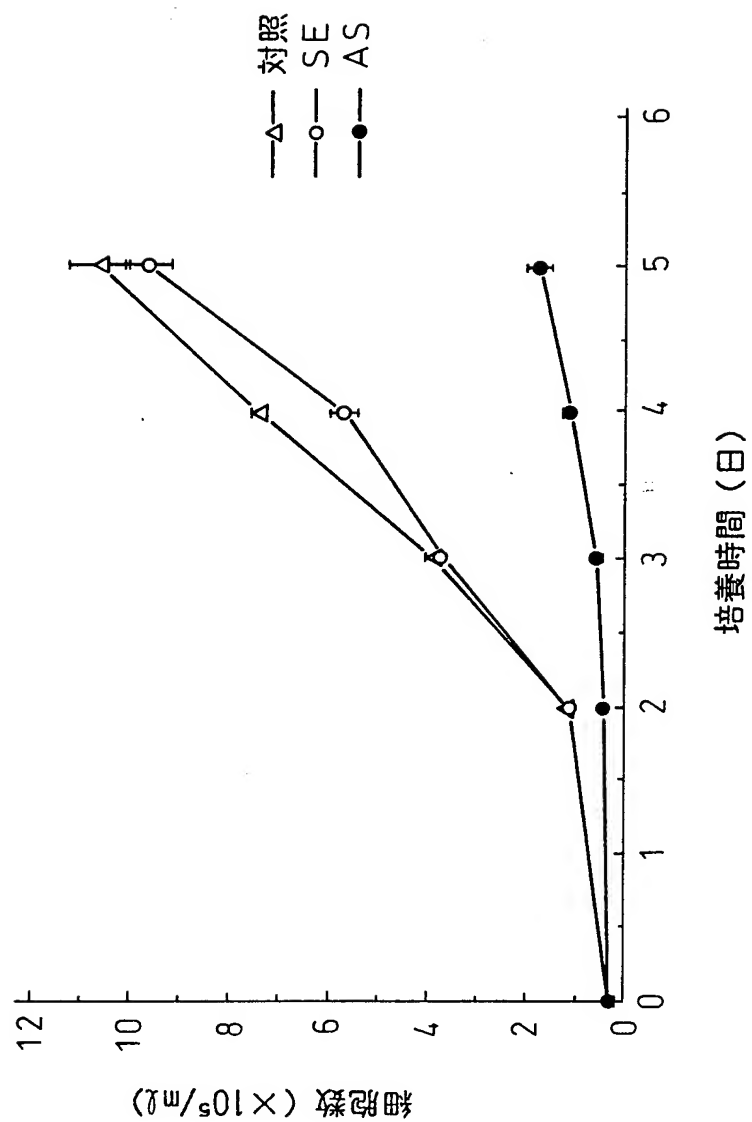


Fig.5

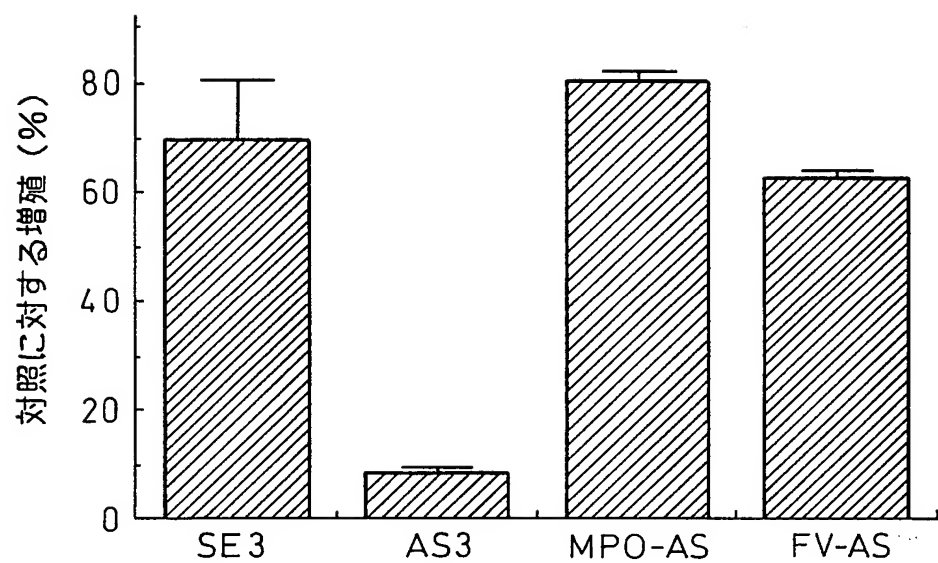


Fig.6

H E L 細胞

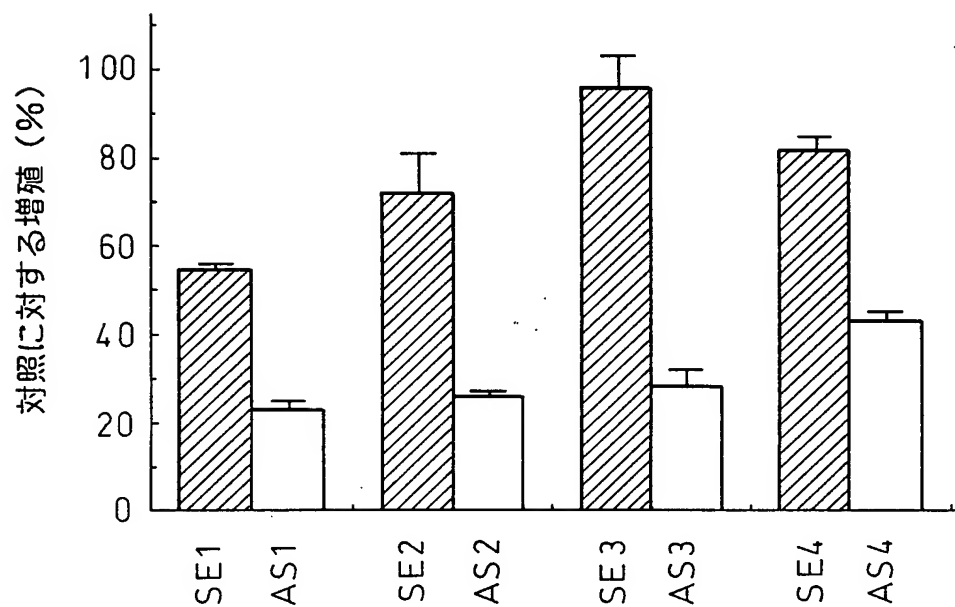


Fig.7

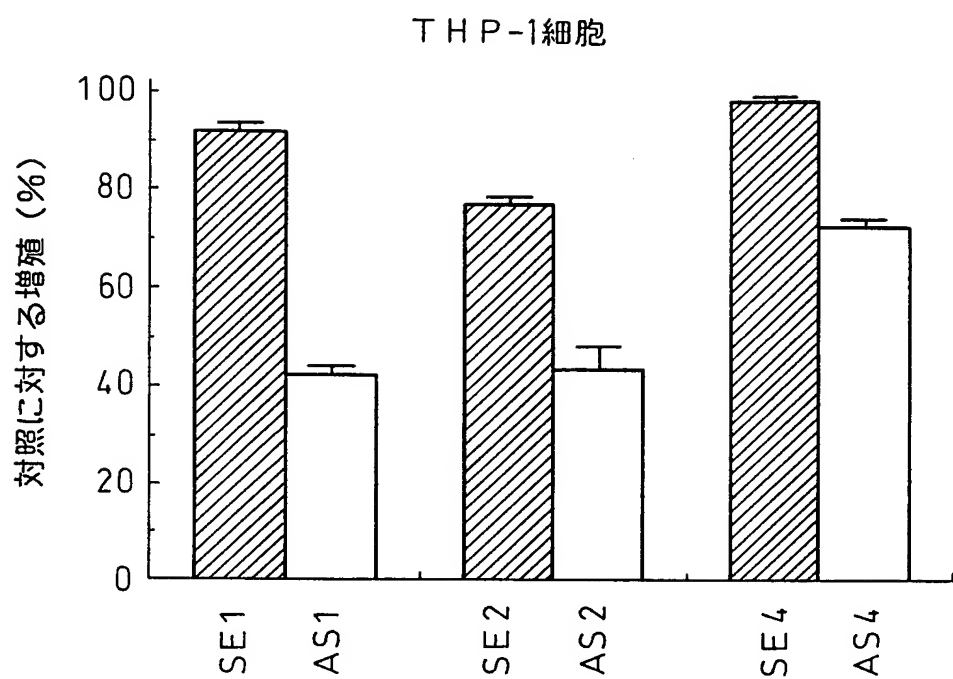


Fig.8

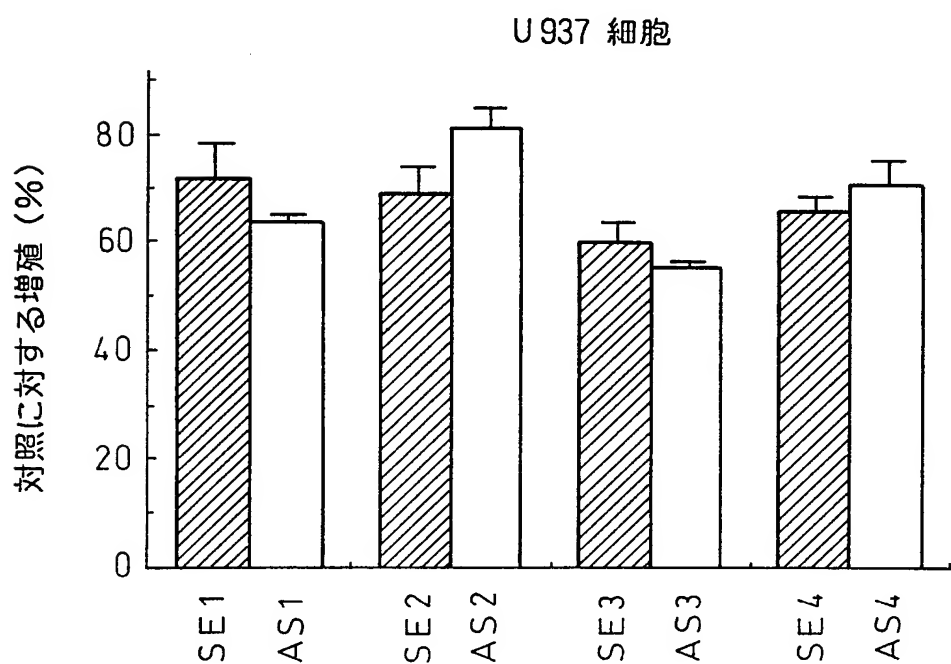


Fig.9

CFU-L

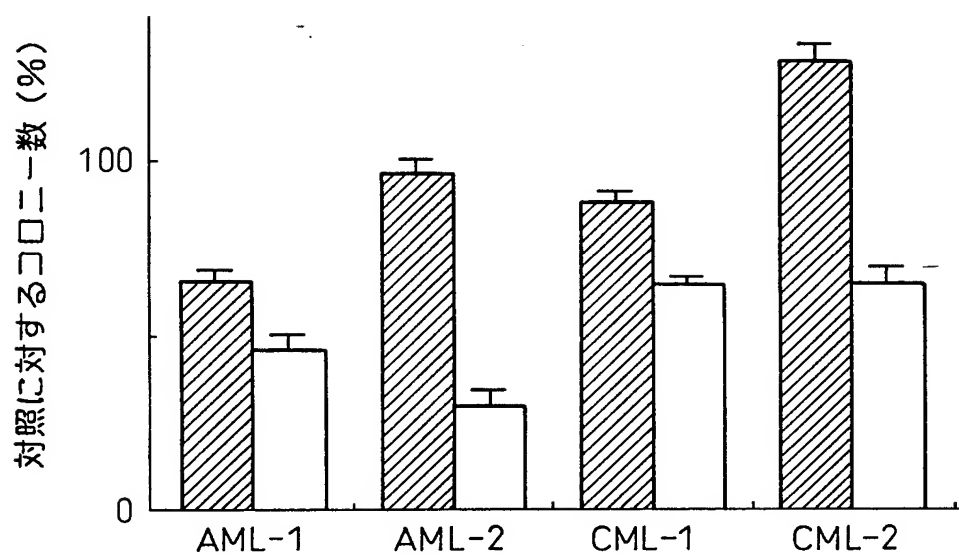


Fig.10

CFU-GM

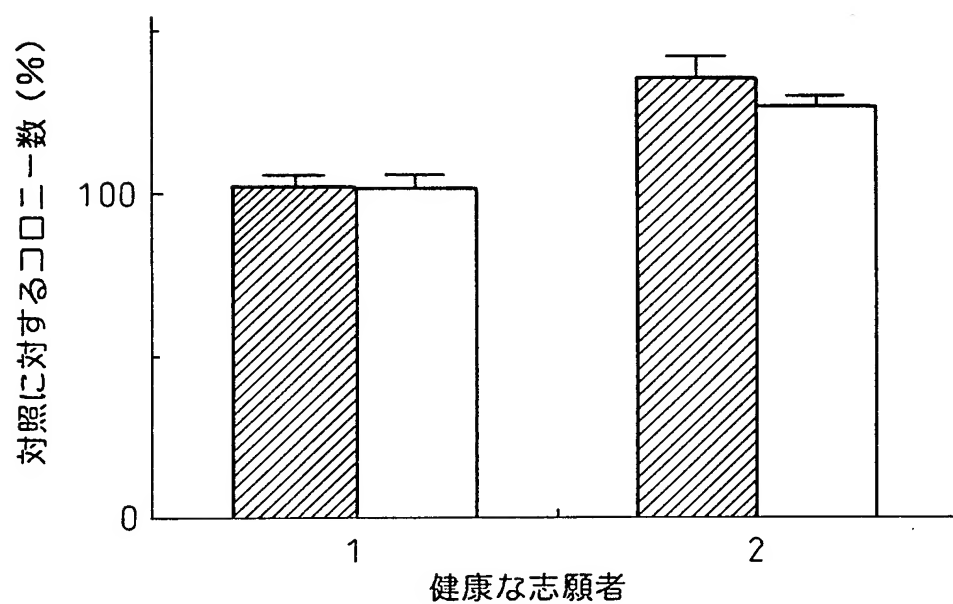
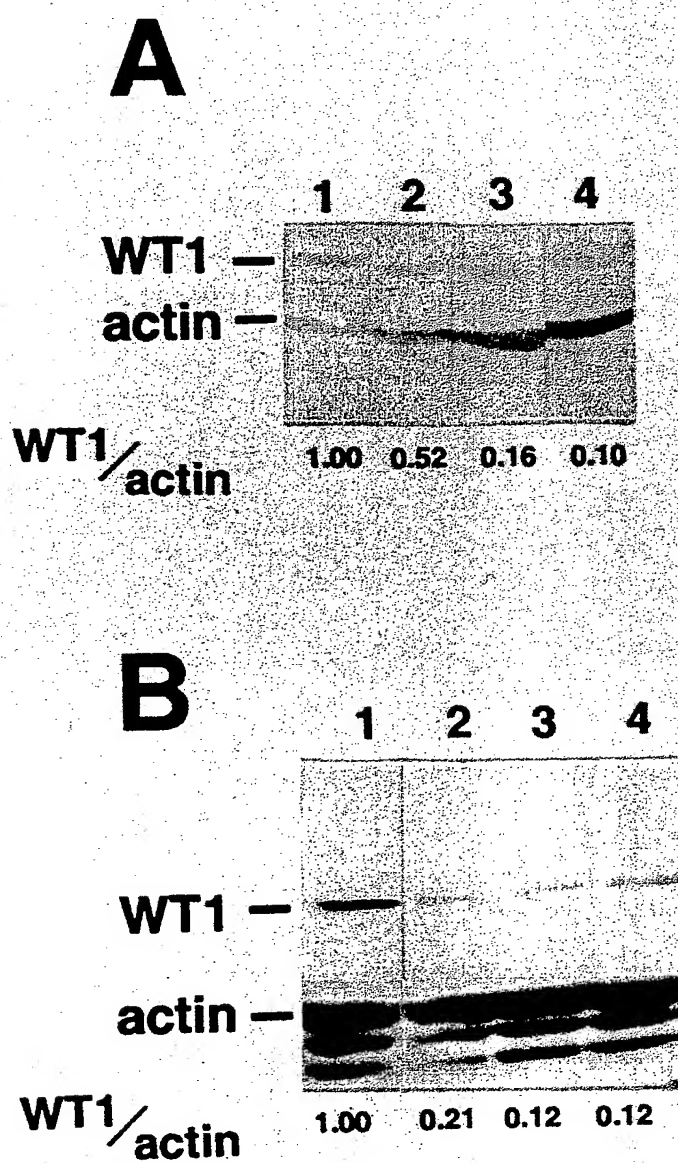


Fig.11



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/01394

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ A61K48/00, 31/70 // C07H21/02, 21/04, C12N15/11, 15/63

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ A61K48/00, 31/70

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| Y | Blood, Vol. 84, No. 8 (1994), p. 2672-2680, (K. Inoue et al.) | 1 - 8 |
| Y | Blood, Vol. 84, No. 9 (1994), p. 3071-3079, (K. Inoue et al.) | 1 - 8 |
| Y | Human Molecular Genetics, Vol. 3, No. 9 (1994), p. 1633-1637, (K. Pritchard-Jones et al.), | 1 - 8 |
| Y | Nature, Vol. 343 (1990), p. 774-778, (M. Gessler et al.) | 1 - 8 |
| Y | Cell, Vol. 60, No. 3 (1990), p. 509-520, (K. M. Call et al.) | 1 - 8 |
| Y | Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol. 88, No. 21 (1991), p. 9618-9622, (D. A. Haber et al.) | 1 - 8 |
| A | WO, 95/29995, A (Wistar Institute of Anatomy and Biology), November 9, 1995 (09. 11. 95) (Family: none) | 1 - 8 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
August 13, 1996 (13. 08. 96)

Date of mailing of the international search report
August 20, 1996 (20. 08. 96)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office
Facsimile No.

Authorized officer
Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/01394

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| P | The Japanese Journal of Clinical Hematology, Vol. 36, No. 6 (1995), p. 552-228, (Kazushi Inoue, et al.) | 1 - 8 |

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁴ A 61 K 48 / 00, 31 / 70
// C 07 H 21 / 02, 21 / 04, C 12 N 15 / 11, 15 / 63

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁴ A 61 K 48 / 00, 31 / 70

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| Y | Blood, Vol. 84, No. 8 (1994), p. 2672-2680, (K. Inoue 他) | 1-8 |
| Y | Blood, Vol. 84, No. 9 (1994), p. 3071-3079, (K. Inoue 他) | 1-8 |
| Y | Human Molecular Genetics, Vol. 3, No. 9 (1994), p. 1633-1637, (K. Pritchard-Jones 他) | 1-8 |
| Y | Nature, Vol. 343 (1990), p. 774-778, (M. Gessler 他) | 1-8 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13.08.96

国際調査報告の発送日

20.08.96

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

松浦新司

4C

8314

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

| C (続き). 関連すると認められる文献 | | |
|----------------------|---|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| Y | Cell, Vol. 60, No. 3 (1990), p. 509-520, (K. M. Call 他) | 1-8 |
| Y | Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol. 88, No. 21 (1991), p. 9618-9622, (D. A. Haber 他) | 1-8 |
| A | WO, 95/29995, A, (Wistar Institute of Anatomy and Biology) 9. 11月. 1995 (09. 11. 95) (ファミリーなし) | 1-8 |
| P | 臨床血液, Vol. 36, No. 6 (1995), p. 552-228, (井上和司 他) | 1-8 |